AMEA-nın Xəbərləri (biologiya və tibb elmləri), cild 68, №2, səh. 37-44 (2013)

Noxud bitikisinin genetik müxtəlifliyinin ISSR və RAPD markerlərlə tədqiqi

S.Q. Həsənova[1], C.M. Ocaqi[1], L.Ə. Əmirov[1]. Ə.Ç. Məmmədov[2]

[1] *AMEA Genetik Ehtiyatlar İnstitutu, Azadlıq prospekti, 155, Bakı AZ1106, Azərbaycan;*
E-mail: Saida.hasanova@ yahoo.com
[2] *AMEA Botanika İnstitutu, Badamdar şossesi, 40, Bakı AZ1073, Azərbaycan*

62 noxud nümunəsində genetik polimorfizmi tədqiq etmək üçün 15 ISSR və 30 RAPD praymerlərdən istifadə edilmişdir. Tədqiqat zamanı RAPD və ISSR praymerlərinin tətbiqi nəticəsində polimorfizmin orta qiyməti müvafiq olaraq 98% və 80%-ə bərabər hesablanmışdır. Hər iki marker əsasında müəyyən edilmiş genotiplərin genetik oxşarlıq indeksinin orta qiyməti 0,65-ə bərabər olmuş, klaster analizi nümunələri 0,27-1 oxşarlıq indeksi sərhəddində 12 əsas klasterdə qruplaşdırmışdır. Nei genetik müxtəliflik indeksinin orta qiyməti (RAPD və ISSR praymerlərində müvafiq olaraq 0,85 və 0,73) nümunələrin identfikasiyasında hər iki markerin effektiv olduğunu əks etdirir. Təcrübələr nəticəsində RAPD praymerlərdən OPD 02, OPD 11, OPS 09, OPD 4, OPF 03 və OPG 4, ISSR praymerlərdən isə UBC 880, UBC 810, UBC 808 və UBC 827 noxud bitkisinin genetik tədqiqatlarında ən effektiv praymerlər kimi qiymətləndirilmişdir. UBC 880 ISSR praymeri və onun SCAR (sequence characterized amplified region-amplifikasiya sahəsini səciyyələndirən ardıcıllıq) praymeri işləndikdən sonra quraqlığa davamlı noxud genotiplərinin seçilməsində istifadə oluna bilər.

Açar sözlər: *DNT-nin polimorfizmi, molekulyar markerlər, ISSR, RAPD, klaster analizi, Cicer arietinum* L.

GİRİŞ

Mövcud olan mədəni və yabanı bitki genofondunun pasportlaşdırılması, qorunub saxlanılması, eləcə də ərzaq təhlükəsizliyi və seleksiya zamanı səmərəli istifadə olunması üçün molekulyar marker texnologiyası geniş şəkildə tətbiq olunur. Molekulyar markerlər (RAPD, ISSR, SSR, RFLP, AFLP və s.) ayrı-ayrı genotiplərin DNT ardıcıllığındakı polimorfizmini müxtəlif şəkillərdə üzə çıxarır, genetik variasiyanı müəyyən edir, bir-birinə morfoloji cəhətdən çox yaxın olan mədəni növləri ayıra bilir və taksonomik, filogenetik qohumluqları təyin edir (Lowe et al., 1996). Bu markerlər təsadüfi (RAPD, ISSR, AFLP, SRAP və s.) və spesifik (SSR, SNP, CAPS və s.) olmaqla iki qrupa bölünür (Lowe et al., 1996).

Noxud (*Cicer arietinum* L.) öz-özünə tozlanan, diploid (2n=16), xromosom sayına malik, genomunun ölçüsü 740 Mbp olan birillik bitkidir (Van Der Maesen, 1987). Bu bitki *Leguminosae* ailəsinin *Papilionacea* fəsiləsinin əsas növlərini özündə birləşdirən *Viceae* sırasının *Cicer* cinsinə daxildir (Sehirali, 1988).

Chowdhury və həmkərları 19 noxud genotipi arasında genetik oxşarlığı müəyyən etmək üçün 22 RAPD və 22 ISSR praymerləri ilə tədqiqat işi aparmış, ISSR praymerlərinin RAPD praymerləri ilə müqayisədə daha az PZR məhsulu əmələ gətirdiyini, analiz olunan noxud nümunələrinin bu praymerlərə görə homogenliyinin yüksək olduğunu qeyd etmişdir (Chowdhury et al., 2002).

Sudapak isə ISSR praymerləri ilə noxudda növlərarası və növdaxili variasiyanı müəyyən edərkən *Cicer* növlərinin ISSR praymerləri ilə asanlıqla fərqləndiyini müəyyən etmişdir (Sudupak et al., 2002).

Ahmad 75 RAPD praymerdən istifadə edərək birillik noxud növlərində genetik əlaqənin müəyyən edilməsi zamanı tədqiqat işi aparmış, bu praymerlərdən 8-nin 9 *Cicer* cinsində genom DNT sintez etdiyini və 115 amplikon alındığını, eyni zamanda hər növə spesifik bir amplikon qeydə alındığını bildirmişdir (Ahmad, 1999).

MATERİAL VƏ METODLAR

Bitki materialı və DNT ekstraksiyası. Tədqiqatda mənşəyi müxtəlif olan, məhsuldarlığına və quraqlığa davamlılığına görə bir-birindən kəskin fərqlənən 62 noxud nümunəsindən istifadə olunmuşdur. Nümunələr AMEA Genetik Ehtiyyatlar İnstitutunda olan Genbankdan əldə olunmuşdur.

Noxud nümunələri sahə şəraitində becərilmiş, sonra hər genotipdən 2 qram təzə yarpaq götürülərək maye azot vasitəsilə toz halına salınmış və tyublara yığılaraq DNT ekstraksiyası üçün istifadə olunmuşdur.

Cədvəl 1. İstifadə olumuş ISSR praymerlərin ardıcıllığı və birləşmə temperaturu

N	Praymer	Ardıcıllıq (5′ - 3′)	T, °C
1	UBC-873	(GACA)4	47.4
2	UBC-810	(GA)8T	49.2
3	UBC-808	(AG)8C	48.8
4	UBC-112	(GACA)4	47.4
5	UBC-880	(GGAGA)3	46.8
6	UBC-827	(AC)8G	47.3
7	UBC-864	(TG)8AA	51.9
8	UBC 859	(TG)8RC	54.0
9	UBC-854	(TC)8RG	54.0
10	UBC-869	(GTT)6	48.0
11	UBC-874	(CCCT)4	51.0
12	UBC-875	(CTAG)4	48.0
13	UBC-877	(TGCA)4	48.0
14	UBC-878	(GGAT)4	48.0
15	UBC-809	(AG)8G	48.2

DNT-nin ekstraksiyası CTAB protokolu əsasında aparılmışdır (Rogers et al., 1985). İzolə edilmiş DNT qatılığı və təmizlik dərəcəsi spektrofotometrik yolla təyin edilmişdir. Hər bir genom DNT 20 ng/µl-ə qədər durulaşdırılmışdır.

ISSR praymerlər üçün PZR reaksiyası. Hər bir nümunə üçün ümumi həcm 25µl olmaqla aşağıdakı tərkibdə PZR qarışığı hazırlanmışdır: 2.5 µl PZR buferi (10X NH4), 2µl dNTP (5 mM), 2 µl praymer (10 µM), 1.5 µl $MgCl_2$ (50 mM), 0.2 µl *Tag* polimeraza və 20 ng ekstraksiya edilmiş genom DNT (5 µl).

№	Genotipin adı	№	Genotipin adı	№	Genotipin adı
1	Lənkəran1	22	Ordub.39	43	Flip 00-19
2	Lənkəran 2	23	Ordub.41	44	Flip 97-32
3	Flip 03-48	24	Qusar 43	45	Sultan
4	Cəlilab. 50	25	Qusar 44	46	TH 1- 04
5	Flip 04-4	26	Flip 97-24	47	Flip 03-34
6	Nərmin 57	27	Flip 03-22	48	Flip 03-17
7	Ağstafa 42	28	Bakı 30	49	Flip 04-38
8	Ağstafa 35	29	Cəlilabad11	50	Flip 03-36
9	İran 48	30	Ağdaş 18	51	Flip 03-71
10	Cəlilabad55	31	Flip 06-18	52	Flip 04-35
11	Sabirabad 59	32	Şamaxı 25	53	Flip 03-22
12	Ordubad 47	33	Yardımlı 27	54	Flip 06-28c
13	Yardımlı28	34	Masallı 30	55	Flip 03-77
14	Flip 06-8	35	Masallı 51	56	Flip 03-27
15	Flip 06-33	36	Biləsuvar 58	57	Flip 04-16
16	Flip 06-61	37	Lerik 33	58	Flip 06-7
17	Abşeron 34	38	Ağstafa 36	59	Flip 06-89
18	Flip 06-33	39	Abşeron 35	60	Flip 32-79
19	Flip 06-161	40	Flip 22-04	61	Flip 05-19
20	Flip 05-169	41	Flip 23-04	62	Flip 06-144
21	Ordubad 39	42	Flip 02-88		

Reaksiya 40 əsas tsikldən, hər bir tsikl isə öz növbəsində 3 mərhələdən (94°S-də 1dəqiqə denaturasiya, 50-55°C temperaturda 45 saniyə praymerin birləşməsi və 72°C-də 1 dəqiqə zəncirin uzanması) ibarət olmuşdur. Başlanğıc temperatur 94°S 2 dəq, yekun temperatur isə 72°C 7 dəq qeyd edilmişdir. İstifadə olunmuş ISSR praymerlərin adı, ardıcıllığı və birləşmə temperaturu cədvəl 1-də göstərilmişdir.

RAPD praymerlər üçün PZR reaksiyası. Hər bir nümunə üçün ümumi həcm 25µl olmaqla aşağıdakı tərkibdə PZR qarışığı hazırlanmışdır: 2.5 µl PZR buferi (10x NH4), 2µl dNTP (5 mM), 2 µl praymer (10 µM), 1.5 µl $MgCl_2$ (50 mM), 0.2 µl *Tag* polimeraza və 20 ng ekstraksiya edilmiş nümunə DNT-si (5 µl). Reaksiya 35 tsikldən, hər bir tsikl isə öz növbəsində 3 mərhələdən (94°C

1dəqiqə, 35-37°C 1dəqiqə, 72°C 1 dəqiqə) ibarət olmuşdur. Başlanğıc temperatur 94°C 2 dəq., yekun temperatur isə 72°C 5 dəq. qeyd edilmişdir. İstifadə olunmuş RAPD praymerlərin ardıcıllığı, birləşmə temperaturu cədvəl 2-də göstərilmişdir.

Cədvəl 2. İstifadə olumuş RAPD praymerlərin ardıcıllığı və birləşmə temperaturu

N	Praymer	Ardıcıllıq (5′ - 3′)	T, °C
1	OPA19	CAA ACG TCG G	34.2
2	OPD02	GGA CCC AAC C	36.2
3	OPD11	AGC GCC ATT G	37.1
4	OPD20	TCCTGGTCCC	34.5
5	OPD4	TCT GGT GAG G	32.3
6	OPG12	CAG CTC ACG A	34.7
7	OPG14	GGA TGA GAC C	30.0
8	OPD10	GGT CTA CAC C	30.0
9	OPF03	CCT GAT CAC C	30.6
10	OPC16	CACACTCCAG	31.6
11	OPG4	AGC GTG TCT G	31.2
12	OPJ 10	GAC GCC ACA C	34.2
13	OPG 10	AAG CCC GAG G	38.7
14	OPH 13	AGG GCC GTC T	39.2
15	OPD 20	ACC CGG TCA C	41.2
16	OPR 2	CAC AGC TGC C	39.1
17	OPC 19	GTT GCC AGC C	38.5
18	OPR 3	ACA CAG AGG G	39.0
19	OPD 18	GTG ATC GCA	32.8
20	OPA 10	G	31.9
21	OPA 07	GAG AGC CAA	33.1
22	OPA 08	C	35.0
23	OPB-08	GAAACGGGTG	34.2
24	OPB-10	GTGACGTAGG	35.0
25	OPB 20	GTCCACACGG	34.2
26	OPE 02	CTGCTGGGAC	33.2
27	OPN 04	GGACCCTTAC	31.9
28	OPO 05	GGTGCGGGAA	35.6
29	OPO 06	GACCGACCCA	35.0
30	OPO 04	CCCAGTCACT	34.2
		CCACGGGAAG	
		AAGTCCGCTC	

Gel elektroforez analizi. Amplifikasiya olunmuş fraqmentlər 1.8%-li aqaroza gelində elektroforetik analiz olunmuşdur. RAPD və ISSR praymerlərlə sintez olunmuş PZR məhsulları 0.5 µq/ml qatılıqlı etidium bromid vasitəsilə geldə rənglənərək "BİO-RAD gelin sənədləşdirilməsi" aparatında şəkli çəkilmişdir.

Nəticələrin statistik analizi. Müəyyən bir amplikonun nümunədə müşahidə olunması 1, olunmaması isə 0 kimi nişanlanmışdır. Nümunələr arasındakı genetik oxşarlıq (GO) Jaccard oxşarlıq indeksi əsasında hesablanmışdır.

$$GO = a/(a+b+c) \quad (1)$$

burada: a - hər iki fərddə olan bəndlərin sayı; b - yalnız birinci fərddə müşahidə olunan bəndlərin sayı; c - isə yalnız ikinci fərddə müşahidə olunan bəndlərin sayıdır (Jaccard, 1908).

Genetik müxtəliflik aşağıda göstərilmiş Nei düsturu əsasında 4 zonanın hər biri üçün hesablanmışdır:

$$H = 1 - \sum P_i^2$$

burada: H - genetik müxtəliflik indeksi; P_i - hər bir amplikonun zonalar üzrə tezliyidir (Nei, 1973).

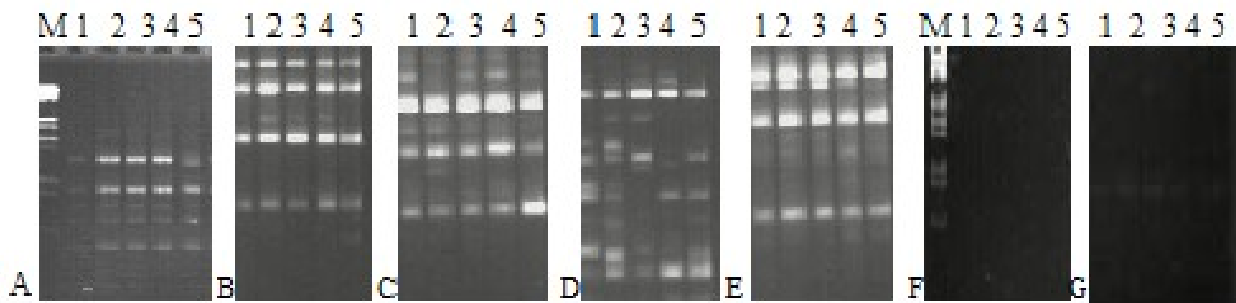
NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

ISSR marker analizi. Noxud genotiplərində polimorf ISSR praymerləri müəyyən etmək üçün 5 genotipin genomu 15 praymer vasitəsi ilə yoxlanılmışdır. İlkin yoxlanma zamanı 5 genotipdə 15 ISSR praymeri ilə 68 amplikon sintez olunmuş, onlardan 34-ü polimorf olmuşdur. 7 praymerlə (UBC 875, UBC 877, UBC 878, UBC 854, UBC 859, UBC 869, UBC 874) amplifikasiya getməmiş, digər 8 ISSR praymer (UBC 112, UBC 808, UBC 809, UBC 810, UBC 880, UBC 827, UBC 864, UBC 873) isə yüksək polimorfluq nümayiş etdirmişdir (Şəkil 1). Ratnaparkhe və həmkarları ISSR markerindən istifadə edərək, noxud və yabanı növlərdə genetik müxtəlifliyin müəyyən olunması (GA)n təkrarına malik praymerlərin orta səviyyədə polimorfizm göstərdiyini bildirmişdir (Ratnaparkhe et al., 1998). Bizim tədqiqatda da (GA)n təkrarına malik praymerlər (UBC 810, UBC 811, UBC 112, UBC 873) digərlərinə

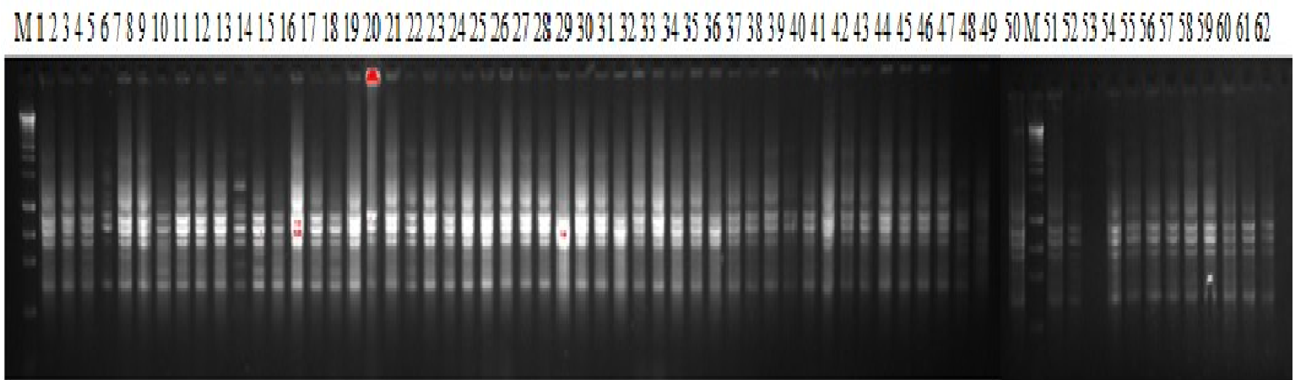
nisbətən daha polimorf olmuşdur.

Seçdiyimiz 8 ISSR praymer 62 noxud genotipində polimorfizmi müəyyən etmək üçün istifadə olunmuşdur. Tədqiqat zamanı ümumilikdə 41 amplikon qeydə alınmış, onlardan 32-si polimorf olmuşdur (şəkil 1). Ən çox amplikon sayı UBC 810 praymerində müşahidə edilmiş və onlardan 5-i polimorf olmuşdur (Şəkil 2). Ümumilikdə, 8 ISSR praymerindən 80% polimorfizm qeydə alınmışdır (cədvəl 3).

Bhagyawant və həmkarları da noxud bitkisi üzərində apardıqları tədqiqat zamanı UBC 880 praymerinin ən polimorfluq göstərdiyi və bu praymerin temperatura davamlı noxud nümunələrini fərqləndirmək üçün istifadə oluna biləcəyini qeyd etmişdir (Bhagyawant and Srivastava, 2008). Bizim tədqiqatlarda da UBC 880 praymeri ilə yalnız quraqlığa davamlı genotiplərdə (*Flip 00-19, Flip 97-32, Flip 97-81, Masallı 30, Flip 22-04, Şamaxı 25, Ağdaş 18, Flip 03-27, Flip 04-38, Flip 97-24)* 630 n.c. uzunluğunda bir spesifik amplikonun sintezi aşkar olunmuşdur (Şəkil 3). UBC 880 praymeri və onun SCAR praymeri işləndikdən sonra onlardan quraqlığa davamlı noxud genotiplərinin skrininqində istifadə etmək olar.



Şəkil 1. UBC 873 (A), UBC 864 (B), UBC 880 (C), UBC 810 (D), UBC 809 (E), UBC 854 (F), UBC 869 (G), praymerləri ilə 5 noxud genotipində aparılan PZR analizinin nəticələri.

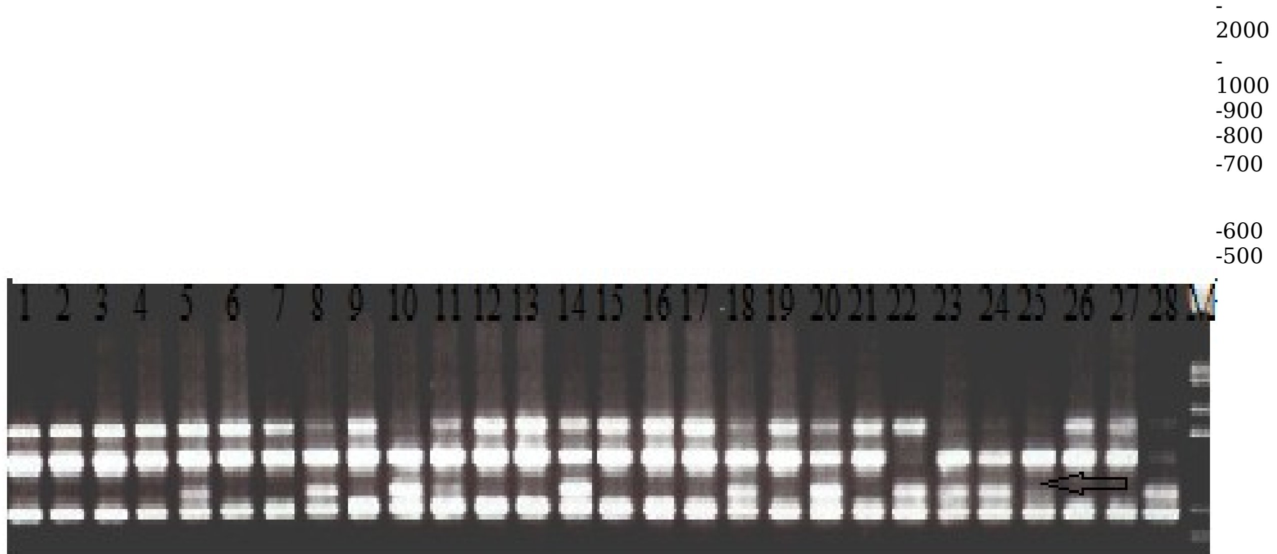


Şəkil 2. Noxud nümunələrinin UBC-810 ISSR praymeri ilə amplifikasiyası nəticəsində alınmış amplikonların
1,8%-li aqaroza məhlulunda elektroforetik analizi

Cədvəl 3. 8 ISSR praymeri ilə əldə olunmuş amplikonların sayı, polimorf amplikonların sayı, polimorfizm (%)
və genetik müxtəliflik indeksi (GMİ).

Praymer	Amplikonların sayı	Polimorfik amplikonların sayı	Polimorfizm, %	GMİ
UBC-873	4	3	75	0.60
UBC-810	8	5	62.5	0.84
UBC-808	5	4	80	0.84
UBC-112	5	4	80	0.75
UBC-811	6	4	66.7	0.67

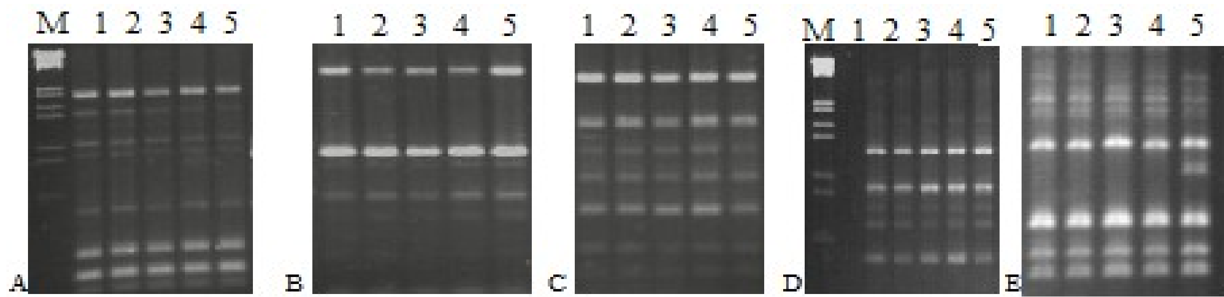
UBC-827	5	5	100	0.79
UBC-864	4	4	100	0.74
UBC-809	4	3	75	0.66
Cəm	**41**	**32**	**80%**	**0.73**
Orta qiymət	**5**	**4**		



Şəkil 3. UBC 880 praymeri ilə sintez olunmuş PZR məhsullarının 1.8%-li aqaroza gel analizi: *5-Flip 00-19, 8-Flip 97-32, 10-Flip 97-81, 14-Masallı 30, 18-Flip 22-04, 20-Şamaxı 25, 22-Ağdaş 18, 23-Flip 03-27, Flip 04-38, 28- Flip 97-24*

RAPD marker analizi. Polimorf RAPD praymerləri tapmaq üçün 5 noxud nümunəsində 30 praymerdən istifadə olunaraq genom DNT ilə PZR analizi aparılmışdır. Bütün praymerlərdə amplikon müşahidə olunmuşdur. İlkin yoxlama zamanı 166 amplikon alınmış, bunlardan 98 polimorf olmuşdur. Bu praymerlərdən 19 polimorfizmi aşkar edilməmiş və ya onların istifadəsi elektroforezdə olduqca az fərqlənən bəndlərin təzahürü ilə nəticələnmişdir. Digər 11 praymer (OPA 19, OPD02, OPD 02 , OPD 10, OPD 11, OPD 4, OPS 09, OPG 12 OPG 14, OPF 03, OPC 16) isə yüksək polimorfizmə malik olmaqla, polimorfizmin öyrənilməsində münasib hesab edilmiş və bu praymerlər 62 noxud nümunəsində genetik müxtəlifliyi müəyyən etmək üçün istifadə olunmuşdur (Şəkil 4). Tətbiq olunan praymerlərin adı, amplikonların sayı, polimorf amplikonların sayı və polimorf amplikonların faizlə miqdarı cədvəl 4-də verilmişdir.

Beləliklə, 62 noxud genotipində 11 RAPD praymerdən 77 amplikon qeydə alınmış, onlardan 76 amplikon polimorf olmuşdur. Müəyyən olunan polimorfizmin qiyməti isə 80-100% arasında dəyişmişdir. Chowdhury və həmkarları da 19 noxud nümunəsində genetik əlaqəni müəyyən etmək üçün 22 RAPD və 22 ISSR markerindən istifadə etmiş, RAPD praymerlərinin ISSR praymerlərinə görə daha çox amplikon yaratdığını bildirmişlər (Chowdhury et al., 2002). Birillik noxud növləri arasındakı genetik əlaqəni müəyyən etmək üçün Ahmad tərəfindən aparılmış digər tədqiqat işində 8 RAPD praymerindən 115 amplikon sintez olunmuşdur (Ahmad, 1999).

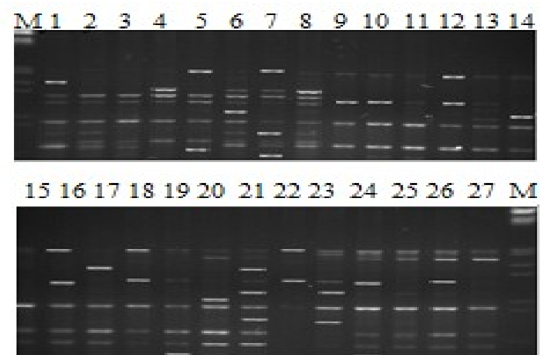


Şəkil 4. OPD 11 (A), OPD 10 (B), OPC 16 (C), OPD 02 (D), OPG 12 (E), praymerləri ilə 5 noxud genotipində aparılan RAPD analizinin nəticələri

Cədvəl 4. 11 ədəd RAPD praymeri ilə əldə olunmuş amplikonların sayı, polimorfik amplikonların sayı, polimorfizm (%) və genetik müxtəliflik indeksi (GMİ).

№	Praymer	Ardıcıllıq (5′ - 3′)	Amplikonların sayı	Polimorf amplikonların sayı	Polimorfizm (%-lə)	GMİ
1	OPA 19	CAA ACG TCG G	12	12	100.0	0.66
2	OPD 02	GGA CCC AAC C	8	8	100.0	0.91
3	OPD 11	AGC GCC ATT G	8	8	100.0	0.93
4	OPS 09	TCCTGGTCCC	4	4	100.0	0.97
5	OPD 4	TCT GGT GAG G	5	4	80.0	0.94
6	OPG 12	CAG CTC ACG A	10	8	80.0	0.75
7	OPG 14	GGA TGA GAC C	3	3	100.0	0.63
8	OPD 10	GGT CTA CAC C	5	5	100.0	0.72
9	OPF 03	CCT GAT CAC C	10	10	100.0	0.97
10	OPC 16	CACACTCCAG	7	6	80.0	0.85
11	OPG 4	AGC GTG TCT G	4	4	75.0	0.90
	Cəm	**-**	**77**	**76**	**98.7**	**-**
	Orta qiymət	**-**	**7.0**	**6.9**	**98.6**	**0,85**

Apardığımız tədqiqat zamanı polimorf bəndlərin böyük miqdarına OPA 19 (Şəkil 5), OPG 12 və OPF 03 praymerləri, az miqdarına isə OPD 4 praymeri malik olmuşdur. Bəndlərin orta sayı hər praymer əsasında 7 bərabər olmuşdur ki, bu da qeyd olunan praymerlərin DNT polimorfizminin təyinində effektivliyini bir daha təsdiqləyir. Bütün praymerlər arasında zəngin genetik müxtəliflik OPS 09 və OPF 03, zəif genetik müxtəliflik isə OPG 14 praymeri ilə müəyyən edilmişdir. Praymerlərlə əldə olunan nəticələrə əsaslanaraq təyin edilmiş genetik müxtəlifliyin orta qiyməti 0.85 hesablanmışdır. Genetik müxtəlifliyin orta qiymətinin böyük olması tədqiqat obyekti kimi seçilmiş genotiplərin genom səviyyəsində müxtəlifliyinin yüksək olduğunu sübut edir. Sudupak və həmkarları da *Cicer* cinsinə aid növlərin filogenetik əlaqəsinin tədqiqi zamanı 7 RAPD praymerdən 95 amplikon sintez etmiş, bu amplikonların 92 polimorf olmuşdur (Sudupak, 2002).



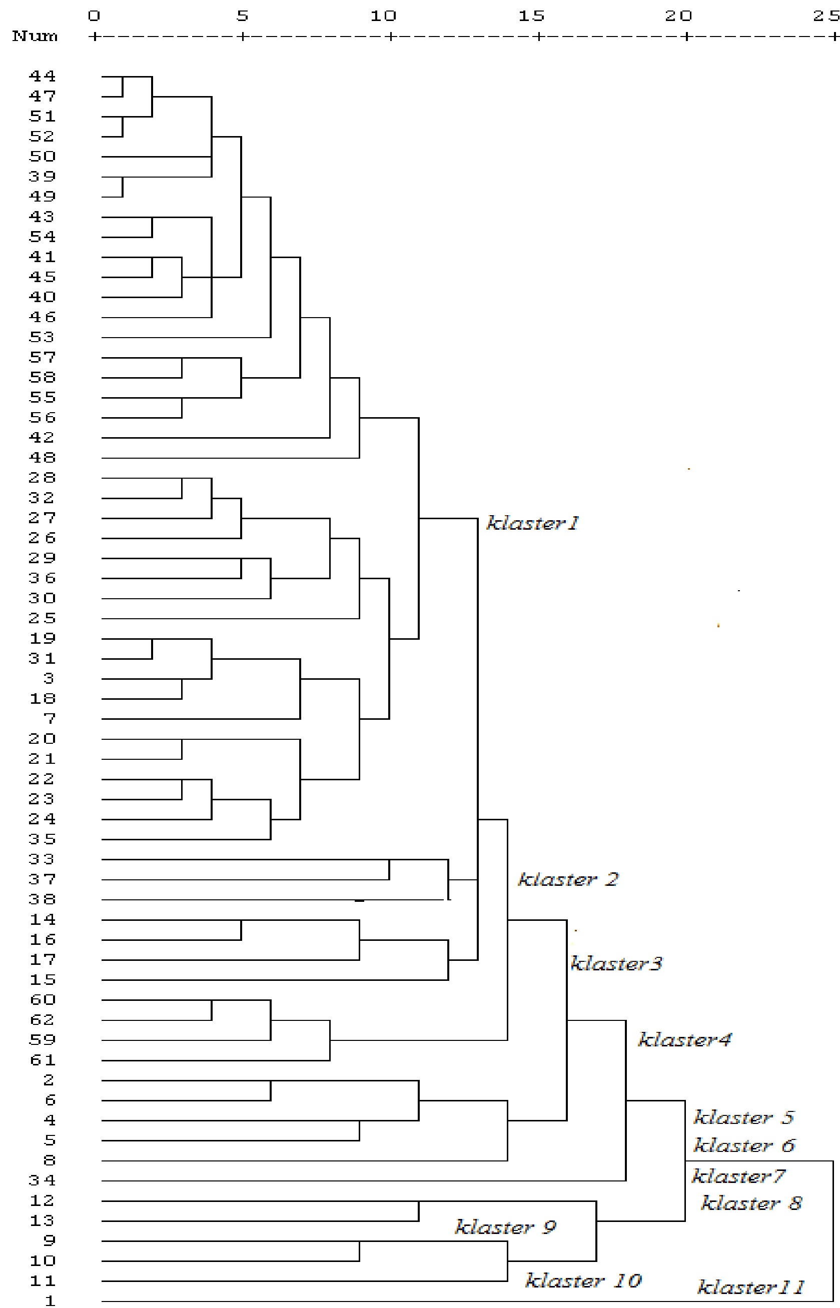
Şəkil 5. OPA 19 praymeri ilə sintez olunmuş PZR məhsullarının 1,8%-li aqaroza gelində elektroforetik analizi

ISSR və RAPD marker analizlərinin müqayisəli təhlili. ISSR və RAPD marker analizlərindən əldə edilən nəticələr həm ayrı-ayrılıqda, həm də birləşdirilərək SPSS proqramı vasitəsi ilə dendroqram qurulmuş və müqaisəli təhlil olunmuşdur. Genotiplər ISSR praymeri ilə 8, RAPD praymeri ilə 12 klasterdə qruplaşmışdır Bu da RAPD praymerlərinin daha polimorf olduğunu göstərir. Hər iki dendroqramda Flip 32-

79, Flip 05-19, Flip 06-144 nümunələri eyni klasterdə bir-birinə yaxın genetik məsafədə qruplaşmışdır. RAPD praymeri ilə qurulmuş dendroqramda Lənkəran1, Yardımlı 28, Ağstafa 35, Masallı 51 nümunələrinin hər biri ayrıca klasterdə yerləşmişdir. Eyni zamanda bu hal ISSR klasterində də qeydə alınmışdır. RAPD və ISSR marker analizlərində qurulmuş dendroqramların oxşar olması digər tədqiqatçılar tərəfindən də qeyd edilmişdir (Fernandez, 2002; Tanyolac, 2003).

62 noxud genotipi arasında genetik oxşarlıq SPSS paket proqramı Jaccard oxşarlıq indeksi əsasında hesablanmışdır. Aparılan analizin nəticəsində Jaccard genetik oxşarlıq indeksinin orta qiyməti 0.65-ə bərabər olmuş, genetik baxımdan bir-birinə yaxın genotiplərin Flip 03-71 və Flip 04-35, Sultan və TH 1-04, Flip 97-32 və Flip 03-34, Flip 22-04 və Flip 04-38, Flip 00-19 və Flip 06-28, Flip 02-88 və Sultan, Flip 03-48 və Flip 06-33, Flip 06-18 və Flip 06-161, Flip 05-169 və Ordubad 39, bir-birinə ən uzaq genotiplərin isə (genetik oxşarlıq indeksi 0,27 olmaqla) Lənkəran 1 və Qusar 43, Lənkəran1 və Ordubad 41, Yardımlı 28, Flip 97-32 olduğu qeydə alınmışdır. Hər iki analizin (RAPD və ISSR) nəticələri birləşdirilərək UPGMA metodu əsasında (Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean) SPSS paket proqramında tərtib olunmuş dendroqram Şəkil 6-da verilmişdir. Dendroqramdan göründüyü kimi nümunələr 11 klasterdə qruplaşmışdır. I klaster 39, II klaster 3, III, IV, V klasterlər hər biri 4, VI, VII, X və XI klasterlər 1, VIII, IX klasterlər 2 genotipdən ibarət olmuşdur. Birinci klaster 20 və 19 nümunədən ibarət iki yarımqrupa bölünmüşdür. Birinci A yarımqrupda yerləşən nümunələrin 18-i İCARDA-dan introduksiya olunmuş genotiplərdir. Yüksək perpektivli nümunələr kimi qiymətləndirilmiş Flip 00-19, Flip 97-32, Sultan və TH 1-04 genotipləri də bu yarımqrupda yerləşmişdir (Mirzəyev və b., 2010). Birinci B yarımqrupundakı nümunələrin 10-u yerli, 9-u isə İCARDA-dan əldə olunmuşdur. Nərmin, Ağstafa 42, Lənkəran 2 və Cəlilabad 50 nümunələri hündür boylu və yüksək məhsuldar nümunələr olub eyni klasterdə (V klaster) qruplaşmışdır.

Nümunələrin mənşəyi ilə klasterdə yerləşməsi arasında ümumi əlaqə tapılmasa da, bəzi genotiplərdə uyğunluq müşahidə edilmişdir. Belə ki, Ordubad 41 və Ordubad 39, Qusar 43 və Qusar 44, Flip 32-79, Flip 05-19, Flip 06-144, Flip 06-89 və s. eyni klasterdə yerləşmişdir. Beləliklə, əldə olunan nəticələr, eləcə də Nei genetik müxtəliflik indeksinin orta qiyməti (RAPD və ISSR markerlərində müvafiq olaraq 0,85 və 0,73) nümunələrin identfikasiyasında hər iki markerin daha effektiv olduğunu əks etdirir. Eksperiment nəticəsində RAPD praymerlər arasında OPD 02, OPD 11, OPS 09, OPD 4, OPF 03 və OPG 4, ISSR markerlər arasında isə UBC 810, UBC 808 və UBC 827 praymerləri noxud bitkisinin genetik tədqiqatlarında ən effektiv praymerlər kimi qiymətləndirilmişdir.



Şəkil 6. ISSR və RAPD markerləri əsasında 62 noxud genotipinin genetik qohumluğunu əks etdirən dendroqram

Ölkəmizdə noxud bitkisi ilə aparılan tədqiqarlarından abiotik və biotik stress amillərinə davamlı yeni nümunələri müəyyən etmək üçün yuxarıda qeyd olunan praymerlərdən istifadə oluna bilər. Eyni zamanda, Jaccard oxşarlıq indeksinə əsasən genetik baxımdan bir-birindən uzaq məsafədə yerləşən genotipləri seleksiya proqramlarında tətbiq etmək olar.

MINNƏTDARLIQ

Bu iş Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Elmin İnkişafı Fondunun maliyyə dəstəyi ilə yerinə yetirilmişdir(**Qrant № EIF-2011-1(3)-82/51/3).**

ƏDƏBİYYAT

Mirzəyev R.S. Əmirov L.Ə., Cahangirov A.A. (2010). Perspektivli noxud nümunələrinin öyrənilməsi. AETƏİ Elmi əsərləri məcmuəsi, **XXII:** 96-98.

Sehirali S. (1988) Yemeklik Tane Baklagiller Ders Kitabı. Ankara Üniversitesi Zir. Fak. Yayınları, **No:224**.

Ahmad F. (1999) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis Reveals Genetic Relationships Among the Annual Cicer Species. Theor. Appl. Genet*.* **98:** 657-663.

Bhagyawant S.S., Srivastava N. (2008) Genetic fingerprinting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm using ISSR markers and their relationships. African journal of Biotechnology*,* **7 (24):** 4428-4431.

Chowdhury M.A., Vandenberg B., Warkentin T. (2002). Cultivar Identification and Genetic Relationship Among Selected Breeding Lines and Cultivars in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Euphytica*,* **127:** 317–325.

Fernandez M.E., Figueiras A.M., Benito A.M. (2002). The Use of ISSR and RAPD Markers for Detecting DNA Polymorphism, Genotype Identification and Genetic Diversity among Barley Cultivars with Known Origin. Theoretical and Applied Genetics*,* **104:** 845-851.

Jaccard P. (1908). Nouvelles Reserches sur la Distribution Florale. Bull. Soc.Vaud. Sci. Nat.*,* **44:** 223-270.

Lowe A.J., Hanotte O., Guarino L., (1996) Standardization of Molecular Genetic Techniques for the Characterization of Germplasm Collections: The Case of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Plant Genetic Resources Newsletter*,* **107:** 50-54.

Nei M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided population. Proc. Nat. Acad. Sci.*,* **70:** p. 3321-3323.

Ratnaparkhe M.B., Santra D.K., Tullu A., Muehlbauer F.J. (1998) Inheritance of Inter-Simple Sequence Repeat Polymorphism and Linkage with a Fusarium Wilt Resistance Gene in Chickpea. Theor. Appl. Genet.*,* **96:** 348-353.

Rogers S.O., Bendich A.J. (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant. Mol. Biol.*,* **5:** 69-76.

Sudupak M.A., Akkaya M.S., Kence A. (2002) Analysis of genetic relationships among perennial and annual Cicer species growing in Turkey using RAPD markers. Theor. Appl. Genet.*,* **105:** 1220-1228.

Tanyolac B. (2003) Inter-Simple Sequnce Repeat (ISSR) and RAPD Variation Among Wild Barley (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) Populations from West Turkey. Genetic Resources and Crop Evolution*,* **50:** 611-614.

Van Der Maesen L.J.G. (1987) Origin, History and Taxanomy of Chickpea. In: The Chickpea (eds.) M.C. Saxena and K.B.Singh, CAB International, England*,* Pp.11-34.

Исследование Генетического Разнообразия Растений Нута С Помощью ISSR И RAPD Маркеров

С.Г. Гасанова, Дж. Оджаги, Л.А. Амиров, А.Ч. Маммадов

Институт генетических руесурсов НАНА

С целью изучения генетического полиморфизма среди 62 образцов нута былы использованы 15 ISSR и 30 RAPD праймеры. В результате исследования средний уровень полиморфизма для ISSR и RAPD праймеров составил 98% и 80% соответственно. Средний индекс генетического сходства, выявленного на основе двух маркеров, был равен 0,65, образцы кластерного анализа с индексом генетического сходства в пределах 0,27-1В были сгруппированы в 12-ти основных кластерах. Средняя оценка индекса генетического разнообразия Нея (0,85 и 0,73 для RAPD и ISSR маркеров, соответственно) указывает на то, что оба маркера являются эффективными для идентификации образцов. Согласно результатам экспериментов, наиболее эффективными среди RAPD маркеров оказались праймеры OPD 02, OPD11, OPD 09, OPD 4, OPF 03 и OPG 4 , а среди ISSR маркеров - праймеры UBC 808 и UBC827. Праймер UBC 880 ISSR и SCAR праймер (sequence characterized amplified region-отличающиеся последовательности амплифицированных областей) можно использовать при скрининге засухоустойчивых генотипов нута.

Ключевые слова: *молекулярные маркеры, ISSR, RAPD, полиморфизм ДНК, кластерный анализ, Cicer arietinum* L.

Investigation Of Genetic Diversity Of Chickpea Plants With ISSR And RAPD Markers

S.G.Hasanova, J.Ojagi, L.A.Amirov, A.Ch.Mammadov

Institute of Genetic Resourses, ANAS

Genetic polymorphism of 62 chickpea samples have been studied using 15 ISSR and 30 RAPD markers. The avearge levels of polymorphism for ISSR and RAPD were found to be 98% and 80%, respectively. An average value for the genetic similarity index based on 2 markers was 0.65, the samples of cluster analysis with genetic similarity index within the limits of 0.27 to 1 were divided all genotypes into 12 main clusters. The mean values of Nei's genetic diversity index (0.85 and 0.73 for RAPD and ISSR markers, respectively) shows, that both markers are effective for identification of chickpea genotypes. According to results of study, OPD 02, OPD11, OPD 09, OPD 4, OPF 03 and OPG 4 primers of RAPD markers, UBC 808 and UBC 827 primers of ISSR markers appeared to be most effective. UBC 880 primer of ISSR and SCAR primer (sequence characterized amplified region) can be used in the screening of drought tolerant genotypes of chickpea.

Key words: *molecular markers, ISSR, RAPD, DNA polymorfism, cluster analysis, Cicer arietinum* L.